

## · 基础研究 ·

# 益气活血祛湿解毒膏方对急性血栓性浅静脉炎模型兔的影响

李光宗<sup>1</sup> 杨宝钟<sup>1</sup> 庞鹤<sup>1</sup> 李友山<sup>2</sup> 金潇<sup>1</sup> 邢彤<sup>1</sup> 张凡帆<sup>1</sup> 张月<sup>3</sup> 华海琴<sup>4</sup>

**摘要 目的** 观察益气活血祛湿解毒膏方对甘露醇所致的急性血栓性浅静脉炎的药效作用并探讨其起效机制。**方法** 实验用健康日本大耳白兔 16 只随机分为益气活血祛湿解毒膏方组(膏方组)、脉络舒通颗粒组(颗粒组)、空白对照组、模型组,每组 4 只。采用甘露醇输液制成血栓性静脉炎兔子模型。膏方组给予益气活血祛湿解毒膏方 2.34 g/kg 灌胃,每日 2 次;颗粒组给予脉络舒通颗粒 2.80 g/kg,每日 3 次,给药时间 7 天。采用酶联免疫法检测血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、CRP、IL-1 $\beta$  含量,采用 Real Time 荧光定量 PCR 法及 Western blot 法检测 NF- $\kappa$ B、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) mRNA 及蛋白表达。**结果** 日本大耳白兔造模后第 5~7 天陆续出现耳缘静脉红肿,触摸呈条索状,活动减少,食量、饮水减少。与空白对照组比较,模型组 TNF- $\alpha$ 、CRP、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平升高,NF- $\kappa$ B、PKC 蛋白表达及 NF- $\kappa$ B mRNA 表达增高( $P < 0.05$ );与模型组比较,颗粒组、膏方组 TNF- $\alpha$ 、CRP、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平及 NF- $\kappa$ B、PKC 蛋白表达降低,且膏方组低于颗粒组( $P < 0.05$ )。**结论** 益气活血祛湿解毒膏方通过降低炎症因子水平,促进炎症恢复。

**关键词** 急性血栓性浅静脉炎; 益气活血祛湿解毒膏方; 甘露醇

Effect of Ointment of Tonifying Qi and Activating Blood Eliminate Wetness and Disintoxication on Acute Thrombotic Superficial Phlebitis Model Rabbit LI Guang-zong<sup>1</sup>, YANG Bao-zhong<sup>1</sup>, PANG He<sup>1</sup>, LI You-shan<sup>2</sup>, JIN Xiao<sup>1</sup>, XING Tong<sup>1</sup>, ZHANG Fan-fan<sup>1</sup>, ZHANG Yue<sup>3</sup>, and HUA Hai-qin<sup>4</sup>  
1 Department of Peripheral Vascular, Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078); 2 Department of Peripheral Vascular, Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine; Beijing (100700); 3 Nursing Department, Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078); 4 Department of Radiology, Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078)

**ABSTRACT Objective** To observe the pathogenesis effects with Ointment of Tonifying Qi and Activating Blood Eliminate Wetness and Disintoxication (QTQABEWD) on mannitol infusion phlebitis, and to explore its mechanism. **Methods** A total of 16 healthy Japanese white rabbits were selected as experimental animal models. The rabbits were randomly divided into the QTQABEWD group (phlebitis ointment group), the Mailuo Shutong Granule group (granule group), the blank control group and the model group, 4 in each group. The thrombotic phlebitis model was established by inducing mannitol firstly except the blank control group. The phlebitis ointment group was treated with QTQABEWD 2.34 g/kg · d by gavage, twice one day. The rabbits in the granule group was administrated with Mailuo Shutong granules at 2.80 g/(kg · d) by gavage, three times one day. The therapy course lasted for 7 days. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), Creactive protein (CRP), and interleukin-1 (IL-1) were detected by ELISA. The mRNA and protein expressions of NF- $\kappa$ B p65 and protein kinase C (PKC) were detected

基金项目: 2010 年高校博士点基金项目(No. 20100013110001); 北京中医药大学校级课题(No. 2015-JYB-JSMS115)

作者单位: 1. 北京中医药大学东方医院周围血管科(北京 100078); 2. 北京中医药大学东直门医院周围血管科(北京 100700); 3. 北京中医药大学东方医院护理部(北京 100078); 4. 北京中医药大学东方医院放射科(北京 100078)

通讯作者: 庞鹤, Tel: 010-67689737, E-mail: snshine@outlook.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180516.082

ted by Real-Time Polymerase Chain Reaction and Western blot. Result The ear of rabbits swelling occurred at 5 - 7 days after the model was established. Puncture point of peripheral venous was inflamed, swelling, and cord-like, activity and food intake decreasing, and fewer water intake. Compared with the blank control group, the levels of TNF- $\alpha$ , CRP, IL-1 $\beta$ , IL-6, the protein expressions of NF- $\kappa$ B and PKC and the mRNA of expression of NF- $\kappa$ B increased in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the levels of TNF- $\alpha$ , CRP, IL-1 $\beta$  and IL-6 and the protein expressions of NF- $\kappa$ B and PKC were decreased in the phlebitis ointment group and granule group ( $P < 0.05$ ). The decrease was more obvious in the phlebitis ointment group than in the granule group ( $P < 0.05$ ). Conclusion The QTQABEWD can reduce the level of inflammatory cytokines and promote inflammation recovery.

KEYWORDS acute thrombotic superficial phlebitis; Ointment of Tonifying Qi and Activating Blood Eliminate Wetness and Disintoxication; mannitol

急性血栓性浅静脉炎 (superficial thrombophlebitis, STP) 是周围血管疾病里静脉系统疾病之一, 临床表现为沿静脉及分支的浅层静脉出现条索、硬结, 皮肤色红伴有灼热, 局部疼痛拒按, 触之较硬, 其中一部分患者可伴有周围片状潮红、皮肤发热等炎症反应, 自觉症状为下肢疼痛、肿胀, 若症状重者会伴有发热、头痛等全身症状, 严重影响工作和生活<sup>[1]</sup>。应用益气活血祛湿解毒中药治疗急性 STP, 具有携带方便, 便于操作, 质量可控, 作用时间长, 不良反应小, 患者依从性高等特点。益气活血祛湿解毒膏方为北京中医药大学东方医院内部制剂, 自 2015 年开始我科便开始应用。本实验通过动物实验观察益气活血祛湿解毒膏方对甘露醇所致的兔耳缘静脉输液性静脉炎的药效作用, 研究应用中医内服“益气活血祛湿解毒膏方”干预急性 STP 过程中, 血管的病理变化、炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-6、CRP、IL-1 $\beta$ )、信号传导蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、核因子  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 等细胞生物学活性变化。

## 材料与方法

1 实验动物 16 只实验用健康日本大耳白兔, 雌雄各半, 体重 2.5 ~ 3.5 kg, 生产许可证号 SCXK (京)2014 - 0012, 合格证号: 11804900001413, 实验前在实验场所先适应性喂养 1 周, 活动、排便、饮水、饮食等均正常, 无其它系统疾病。饲养条件: 单笼饲养, 自由饮水和摄食, 光照明暗周期 12 h, 室温 ( $20 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $50\% \pm 10\%$ 。实验中所有操作均符合相关动物实验伦理原则, 通过中国中医科学院基础理论所动物伦理审核 (伦理批号: 2016 - 56)。

2 实验药物 “益气活血祛湿解毒膏方” 由北京中医药大学东方医院药剂科制备, 质量检测, 制品生产均符合药品生产质量管理规范标准 (由生黄芪 30 g、

当归 15 g、赤芍 15 g、虎杖 20 g、川芎 12 g、丹参 20 g、三七 6 g、地龙 9 g、苍术 15 g、黄柏 15 g、双花 40 g、生栀子 12 g 组成)。

脉络舒通颗粒由鲁南厚普制药有限公司生产, 规格: 每袋 20 g (无蔗糖), 生产批号: 20150841, 主要成分为: 黄芪、金银花、黄柏、苍术、薏苡仁、玄参、当归、白芍、甘草、水蛭、蜈蚣、全蝎。

3 实验试剂及仪器 Rabbit IL-6 ELISA (批号: E06903Rb), Rabbit il-1beta ELISA (批号: CSB-E06900Rb), Rabbit TNF- $\alpha$  ELISA (批号: E06998Rb), Rabbit CRP ELISA (批号: CSB-E06847Rb) 由 CUSABIO 公司提供。免疫组化两步法试剂盒 (博士德, SV0001, SV0002), DAB 显色试剂盒, 中杉金桥 ZLI-9018; TRNzol 总 RNA 提取试剂, 天根生化科技 (北京) 有限公司提供; PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa 宝生物, 批号 RR047B), ROX plus (TaKaRa 宝生物, 批号: RR82LR); DL2 000 DNA Marker (TaKaRa 宝生物, 批号 3427Q), 引物合成 (Invitrogen 公司)。

全自动多功能酶标仪: MULTISKAN MK3, Thermo, USA; 电热恒温培养箱: DH4000A, 天津泰斯特; MINI shaker: MH-1, kylin-Bell Lab Instruments Qilinbeier; 离心机 Centrifuge 5415D Eppendorf; 分光光度计 NANODROP 2000, Thermo scientific; 凝胶成像系统 Tanon 1600, 上海天能科技有限公司; 荧光定量 PCR 仪 ABI7500, Applied Biosystems。

4 分组及造模方法 选择健康实验日本大耳白兔 16 只, 于实验前 2 天剪去耳缘周围毛发, 清水擦净耳缘部位, 逆毛方向剃毛, 暴露双侧耳缘静脉, 观察皮肤, 称重, 按顺序排列编号。随后应用 Excel 软件将所有动物分组。方法如下: 在第一列按顺序把各动物编号按升序排列, 然后在第二列以 Excel 中自带的

“RAND()”函数插入随机数,以拖曳功能将各个编号附上一个随机号。然后把这些随机数通过“复制”-“选择性粘贴”-“数值”操作而固定下来,再与动物编号一起以“扩展区域”形式按升序排列,即得到了各组的随机号码。分为益气活血祛湿解毒膏方组(膏方组)、脉络舒通颗粒组(颗粒组)、空白对照组、模型组,每组 4 只。造模方法应用 20% 甘露醇<sup>[3]</sup> 参照既往造模方法<sup>[4-7]</sup> 及预实验。操作方法:除空白对照组外,其余各组室温下,采用兔架限制活动,找到兔耳静脉,每侧 1 根,局部去毛、消毒,兔子平静后进行生理盐水预穿刺,确保头皮针在静脉中同时药液无渗漏时更换已准备好的 20 mL 注射器缓慢推助 20% 甘露醇溶液,用药量为 4 mL/kg,每日 2 次,间隔 6 h,速度 1 mL/min,共 7 天。兔耳缘静脉距耳尖 2 cm 处穿刺,静脉滴注时避免药物外渗,有明确外渗时废弃,每次输注固定穿刺点,所有动物两耳均同时使用(见图 1)。造模后每日观察兔的形态学改变及穿刺静脉其周围组织的皮肤颜色,若皮肤变红并有硬结,表示造模成功(经此前预实验结果,此剂量造模成功率 100%,无死亡病例)。造模过程中观察兔耳缘静脉注射后饮食、活动、死亡情况;局部静脉大体表现,有无静脉炎,静脉炎出现时间,静脉炎的严重程度判断等<sup>[8,9]</sup>。



注:A 为空白对照兔;B 为模型兔

图 1 静脉炎造模(造模后干预前)

**5 给药方法** 兔子的用药剂量参考《药理实验方法学》<sup>[2]</sup>。造模成功后 24 h 开始灌胃给药,给药前禁食 2 h。膏方组经灌胃给予益气活血祛湿解毒膏方剂量为每日 2.34 g/kg(相当于成人用药剂量的 10 倍)<sup>[10]</sup>,每日 2 次,间隔 8 h。颗粒组经灌胃给予脉络舒通颗粒剂量为每日 2.80 g/kg,每日 3 次(相当于成人用药剂量的 10 倍)。给药时间 7 天。空白对照组及模型组不给予干预措施。

**6 标本采集** 空白对照组、模型组、膏方组、颗粒组在用药后第 7 日,分别提取标本。在苯巴比妥钠腹腔麻醉下提取活体标本,以静脉穿刺点前方 1.5 cm

处为中心,切下 1 cm<sup>3</sup> 的耳廓组织,进行 Real-time PCR、Western blot 检测。

**静脉血采集:**应用一次性无菌注射器抽取静脉血液,装于离心管中,用离心机 3 000 r/min,离心 10 min,血清分别移入 EP 管中,放入 -20 ℃ 冰箱保存。

## 7 检测指标及方法

**7.1 TNF- $\alpha$ 、IL-6、CRP、IL-1 $\beta$  检测** 采用酶联免疫法检测血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、CRP、IL-1 $\beta$  含量。

**7.2 NF- $\kappa$ B、PKC mRNA 检测** 采用 Real Time 荧光定量 PCR 法检测。实验操作按产品说明书依次进行,应用 TRNzol 总 RNA 提取试剂进行样本 RNA 提取。将采集的组织放入已预冷的研钵中研磨成粉末状;分别加入 Trizol,室温下保存 5 min;随后加入氯仿 0.2 mL,充分振荡离心管,完全混匀,随后室温下放置 5~10 min;应用离心机在 12 000 r/min 下离心 15 min,使用吸管吸取上层水相(70%)到另一新离心管管中。当移入新管后,加入等体积的 -20 ℃ 预冷的异丙醇,然后充分混匀,放置于冰上 10 min;再次应用离心机以 12 000 r/min 的转速离心,15 min,去掉上清液,使用 1 mL 75% 乙醇 Trizol 的比例加入 75% DEPC 乙醇洗涤沉淀(4 ℃ 保存),然后洗去沉淀物,振荡混匀,应用离心机在 4 ℃ 下以 12 000 r/min 的转速高速离心 5 min;最后去掉乙醇液体,室温下静置 5 min,然后再加入 DEPC 处理过的水帮助溶解沉淀。按产品说明书,采用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录。具体引物序列见表 1。cDNA 样品依次配置 Real-time PCR 反应体系。加样后置于 Real-time PCR 仪上进行反应。其程序按下述程序进行:95 ℃,30 s;40 个 PCR 循环(95 ℃,5 s;60 ℃,40s)。扩增反应结束后,按(95 ℃,10 s;60 ℃,60 s;95 ℃,15 s);并逐渐从 60 ℃ 缓慢加热到 99 ℃。各样品的目的基因和内参分别进行 Real-time PCR 反应,每个样本检测 3 个复孔。数据采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法进行分析。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	引物大小(bp)
NF- $\kappa$ B	5'-TACGATGGAACACTACCCCCCTGC-3'	246
	5'-TGTAAGCTCTGGCTCATACGGT-3'	
PKC	5'-CGTCTGCTGTATGAGATGCT-3'	112
	5'-GGACAAGGA TTTGGGGTAGG-3'	
actin	5'-AAGTGCGACGTGGACATCCG-3'	109
	5'-GGGCGGTGATCTCCTTCTGC-3'	

**7.3 NF-κB、PKC 蛋白检测** 采用 Western blot 法检测。样品首先应用 PBS 进行稀释。准备 BCA 工作液 A 液: B 液 = 50: 1, 同时稀释各个提取 BSA 的标准品。以 RIPA 调整蛋白浓度, 通过加入 5 × 还原样品缓冲液, 制备样品终浓度: 4 mg/mL。配制分离胶时, 待检测蛋白样品上样量: 20 μg/孔。电压浓缩胶恒压 90 V, 时间 20 min; 分离胶恒压 160 V。湿转法, 转膜条件: 300 mA 恒流, 0.45 μm 孔径 NC 膜。转膜时间: 小分子量转膜 30 min, 其余转膜 1.5 h。转膜完成后丽春红染色试剂对膜进行染色, 观察转膜效果。封闭: 将膜完全浸没 3% BSA-TBST 中室温轻摇 30 min。一抗孵育: 用 3% BSA-TBST 稀释一抗, PKC (1: 1 000)、P65 (1: 2 000), 4 °C 过夜。TBST 洗膜 5 次, 每次 5 min。二抗孵育: 山羊抗兔 IgG (H + L) HRP, 1: 20 000, 山羊抗小鼠 IgG (H + L) HRP, 1: 10 000, 室温轻摇 40 min。洗膜: TBST 洗膜 5 次, 每次 5 min。显影: ECL 加到膜上后反应 1 ~ 2 min, 胶片曝光: 10 s ~ 5 min (曝光时间随不同光强度而调整), 显影 2 min, 定影。胶片进行扫描用于分析。

**8 统计学方法** 统计学软件应用 SPSS 19.0 软件, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 ANOVA 分析; 两两比较采用 LSD、Dunnnett-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

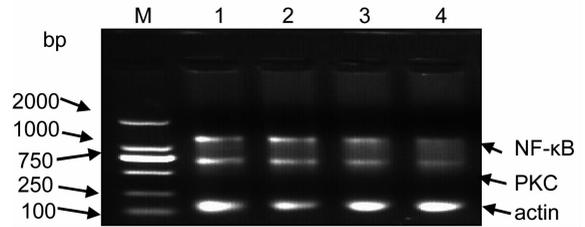
**结 果**

**1 一般状态比较** 兔耳缘静脉造模后 5 ~ 7 天陆续出现穿刺耳朵肿胀, 穿刺点周围静脉红肿, 触摸有条索状, 同时伴有尿黄、活动及食量减少、饮水变少等, 造模成功率为 100%。给药后膏方组及颗粒组穿刺点红肿减轻, 活动及饮食基本恢复正常, 但膏方组静脉周围红肿及条索较颗粒组恢复快, 饮食及尿黄等情况恢复也优于颗粒组。

**2 各组 TNF-α、IL-6、CRP、IL-1β 结果比较 (表 2)** 与空白对照组比较, 模型组 TNF-α、CRP、IL-1β、IL-6 水平升高 (P < 0.05); 与模型组比较, 颗粒组、膏方组 TNF-α、CRP、IL-1β、IL-6 水平降低, 且膏方组低

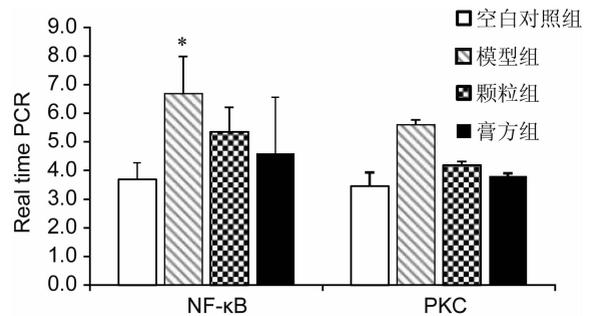
于颗粒组 (P < 0.05)。

**3 各组 NF-κB、PKC mRNA 表达结果比较 (图 2、3)** 与空白对照组比较, 模型组 NF-κB mRNA 表达增高 (P < 0.05)。膏方组组织中 NF-κB、PKC mRNA 表达较颗粒组减低, 颗粒组 PKC mRNA 表达较模型组降低, 但差异均无统计学意义 (P > 0.05)。



注: M 为 DNA Marker: DM2000; 1、2、3、4 依次为模型组、颗粒组、膏方组、空白对照组

图 2 各组 NF-κB、PKC mRNA 电泳图



注: 与空白对照组比较, \*P < 0.05

图 3 各组 NF-κB、PKC mRNA 表达结果比较

**4 各组 NF-κB、PKC 蛋白表达结果比较 (图 4 ~ 6)** 与空白对照组比较, 模型组 NF-κB、PKC 蛋白表达增高 (P < 0.05); 与模型组比较, 颗粒组及膏方组 NF-κB、PKC 蛋白表达降低, 且膏方组低于颗粒组 (P < 0.05)。

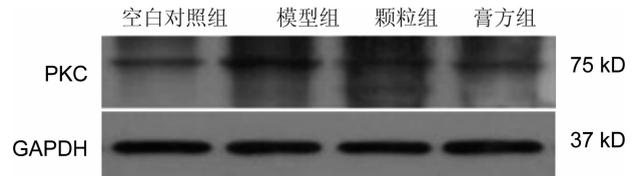


图 4 各组 PKC 蛋白电泳图

表 2 各组 TNF-α、IL-6、CRP、IL-1β 结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TNF-α (pg/mL)	CRP (g/L)	IL-1β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
空白对照	4	0.059 ± 0.039	0.244 ± 0.009	0.090 ± 0.037	0.107 ± 0.008
模型	4	0.141 ± 0.011 *	0.467 ± 0.088 *	0.127 ± 0.010 *	0.161 ± 0.017
颗粒	4	0.115 ± 0.015 Δ	0.333 ± 0.052 Δ	0.104 ± 0.003 Δ	0.127 ± 0.017 Δ
膏方	4	0.070 ± 0.034 Δ▲	0.269 ± 0.016 Δ▲	0.095 ± 0.005 Δ▲	0.107 ± 0.015 Δ▲

注: 与空白组比较, \*P < 0.05; 与模型组比较, ΔP < 0.05; 与颗粒组比较, ▲P < 0.05

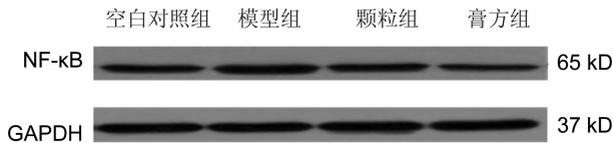
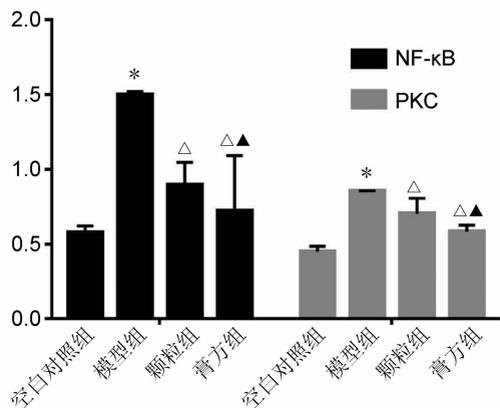


图5 各组 NF-κB 蛋白电泳图



注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ ;与颗粒组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

图6 各组 Western blot 检测结果

## 讨 论

下肢急性 STP 是周围血管疾病中的静脉系统疾病,是临床的常见病和多发病,属中医学“恶脉”、“青蛇毒”、“脉痹”、“黄鳅痢”、“赤脉”等。正如《灵枢·营卫生会》里指出水液的代谢是借助脾胃的升清降浊方可“水精四布,五经并行”,水谷入胃化生精微所经的泌糟粕、蒸津液、化精微的过程亦是暗含了中焦脾胃之气升清降浊的转输作用。在急性 STP 的治疗中亦应更加重视脾胃的调理,因在此病证中,大多表现来为“火热”,临床医师遣药多予黄芩、黄连、黄柏等苦寒之品,最易损伤胃气。此时如果进食补药物又多温热、滋腻之品,过则易损伤脾胃。同时此类患者,多虚实夹杂,全身属虚,局部属实,须要审证调治,虚实兼顾,治疗中应佐以健脾益气,行气活血之品,疏其血气、令其条达,使经络畅达、脏腑协调,阴阳平衡。正如李氏<sup>[11]</sup>所认为,膏方是大方,其特色之一是在诊治中始终贯穿着“因人而宜”的治疗思想。从改变体质入手达到“治未病”的目的,或益气,或补阴,或温阳,或利湿,或开郁,或疏血。益气活血祛湿解毒膏方中采用生黄芪、丹参为主药,应用生黄芪取其慄悍,走而不守之性,益气固表,以助行血消肿之力,“逐五脏之恶血,具有益气,利阴气”之功,利水、化痰、无偏寒、偏热之弊,为“气中血药”<sup>[12]</sup>。丹参一味,养血活血,用于本病可祛瘀血而生新血,使气血通畅,活血行血,使因瘀而聚之水湿消散,配生芪则补泻兼施,气血兼顾。佐以“血中气药”

川芎,辛温香燥,走而不守,既能行散,又入血分,活血祛瘀作用广泛,适宜瘀血阻滞各种病症。芍药养血缓急止痛而通血痹,与桂枝合用,调营卫、和表里;活血药中应用虫类活血药,配上当归补血汤,活血祛瘀、补气养血而不伤正气。然则仅以活血化瘀之品则力量不足,加血肉有情的地龙。地龙通经活络、活血化瘀。当归、丹参、三七、川芎活血祛瘀止痛;黄柏清热利湿解毒;栀子、金银花清热泻火解毒;虎杖清热解毒,散瘀止痛;苍术燥湿健脾,与白术相比,苍术走表之性更强,且祛湿化浊之力优于白术,故用苍术而弃白术。该药方组方简洁,以补气扶正为主,辅以活血通络,清热解毒散结,数味药联合应用,效专力宏,活血祛瘀通络而不伤正气。

现代药理研究中发现丹参成分丹参多酚酸能够稳定血小板聚集、黏附水平,改善血液循环,进而防止栓形成<sup>[13]</sup>。黄芪、丹参提取物能减轻炎症反应程度,ICAM-1、NF-κB (p65) 的表达水平<sup>[14]</sup>。金银花主要成分为绿原酸具有很强的抗炎、抗氧化活性<sup>[15]</sup>。地龙其主要成分有纤维蛋白溶解酶、蚓激酶、蚓胶质酶 3 种酶,有预防、治疗血管疾病的作用<sup>[16]</sup>。当归、芍药、川芎等补血活血功效与其抗贫血、抗血液流变异常、调节超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性等现代药理有较大的关联性,其有效成分可经由 TLR5-NF-κB、Bcl-2/Bax、p38/MAPK 等多条信号通路相互作用多途径、多靶点发挥作用<sup>[17,18]</sup>。同时补气药、活血药可增加组织中 SOD 含量,提高 SOD 活性,增强对自由基的清除作用<sup>[19]</sup>。在前期研究中发现益气祛瘀、解毒通络为法,可明显降低血管炎症反应<sup>[20]</sup>。

脉络舒通颗粒是由四妙勇安汤加味演变而来,是临床口服治疗急性 STP 的常用中成药,具有清热解毒、化痰通络、利湿消肿之功效。用于湿热瘀阻脉络所致的 STP 导致的双下肢肢体肿胀、疼痛、肤色暗红或伴有条索状物。脉络舒通颗粒可以使血管内皮功能受损特异性标志—血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 降低,从而降低血液高凝状态,同时可以降低血小板活化的特征性标志物 CD62p,抑制血栓形成<sup>[21]</sup>。选择脉络舒通颗粒作为阳性对照药物,是因为其具有明确临床试验数据,其给药途径与静脉炎合剂相同,但剂型不同,同时作用机制相似。以上几点均符合实验阳性对照药物选择原则。

有研究发现静脉血栓的患者体内血浆 TNF-α、IL-6、CRP 等炎症标志物表达增高,提示静脉血栓中有炎症的存在<sup>[22,23]</sup>。TNF-α 是炎症反应的重要介质,

可引起其他炎症因子释放,在炎症反应急性期,血浆 TNF- $\alpha$  对血管炎症过程有调节作用,同时影响血管内皮细胞活性<sup>[24]</sup>。IL-6 具有多种生物活性,在免疫调节、应激反应中起重要作用,可刺激肝脏产生纤溶酶原激活物抑制剂,和纤溶酶原激活物结合并使其失去活性,导致纤溶功能降低,促进血栓形成<sup>[25,26]</sup>。本实验中模型组日本大耳白兔 IL-6 较颗粒组、膏方组及空白组明显升高,说明在 STP 急性期 IL-6 明显升高,经过治疗,颗粒组及膏方组 IL-6 数值较模型组降低,表明静脉炎膏方及脉络舒通颗粒可降低日本大耳白兔体内 IL-6 水平,而静脉炎膏方组 IL-6 水平低于阳性药组。CRP 是炎症反应的较敏感指标<sup>[27]</sup>。当炎症反应发生后,刺激肝脏合成 CRP,通过经典途径激活补体,释放炎症介质,促进黏附和吞噬细胞反应<sup>[28]</sup>。其还可以诱导单核细胞表达促凝血因子——组织因子(tissue factor, TF),导致血栓形成。本实验中,模型组日本大耳白兔 CRP 较阳性药组、膏方组及空白组明显升高,反应出在日本大耳白兔 STP 急性期 CRP 升高明显,经过治疗,阳性药组及膏方组 IL-6 数值较模型组降低,但仍高于空白组。IL-1 $\beta$  由活化的单核-巨噬细胞产生<sup>[29]</sup>,通过 NF- $\kappa$ B 信号途径启动靶基因转录,激活凝血酶原,促进血栓形成。大量 IL-1 $\beta$  蛋白的释放使活化的中性粒细胞聚集在血管壁上,促进细胞的前凝血活性增加导致微血栓的形成<sup>[30]</sup>。在动物实验中笔者发现模型组日本大耳白兔血浆中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、CRP、IL-1 $\beta$  较空白对照组明显升高,局部炎症反应对组织有一定破坏作用,降低 TNF- $\alpha$ 、IL-6、CRP、IL-1 $\beta$  等炎症介质的过度合成和释放,有利于控制炎症反应程度,进而有利于急性 STP 的治疗。

张春强等<sup>[31]</sup>发现创伤后炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 在不同时相点、不同的血栓存在状态表达水平不同,认为在血栓形成过程伴随着炎症反应过程。在静脉血栓形成过程中,多形核白细胞(polymorphonuclear, PMN)是主要炎性细胞,也是第一个到达损伤组织的炎性细胞<sup>[32]</sup>。既往研究资料表明 NF- $\kappa$ B 可通过上调促炎因子及促纤维化因子使静脉炎严重程度加重<sup>[33]</sup>。NF- $\kappa$ B 信号传导通路是抑制 PMN 凋亡的信号传导通路,活化的 NF- $\kappa$ B 可诱导中性粒细胞凋亡延迟而使其生命周期延长,激活并产生大量炎症介质和氧自由基<sup>[34]</sup>。Ward C 等<sup>[35]</sup>认为可通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活化,从转录因子水平有效地抑制中性粒细胞的聚集、活化,促进 PMN 凋亡,减轻血栓形成过程中的炎症反应,阻断血栓形成。本实验通过 Real Time PCR 检测发现膏方组组织中 NF- $\kappa$ B 基因达水平改变明显;

阳性药组 NF- $\kappa$ B、PKC 的基因表达改变明显。

持续性的 NF- $\kappa$ B 高活性会使细胞因子表达,白细胞浸润和炎症。PKC 作为丝苏氨酸蛋白激酶,于血管平滑肌细胞的增生过程中参与了细胞信号转导过程,通过磷酸化转录因子在各种组织中广泛分布,并参与了细胞的增殖、分化等,表达参与调控细胞周期,并对细胞生长、凋亡起调节作用<sup>[36,37]</sup>。本次研究结果也是印证了此作用。IL-1 $\beta$  与内皮细胞的 IL-1 $\beta$  受体结合,激活信号通路,导致组织因子释放,从而启动凝血途径,使血浆内的凝血酶激活,同时促使纤维蛋白原变成纤维蛋白,最终促进血栓形成<sup>[29,30]</sup>。在急性 STP 中转录因子 NF- $\kappa$ B 被激活,发挥促进凋亡的作用, TNF- $\alpha$  是巨噬细胞和单核细胞产生的促炎细胞因子,与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、CRP 参与了炎症反应和免疫反应<sup>[34]</sup>。本次实验发现益气活血祛湿解毒膏方可降低 TNF- $\alpha$ 、IL-6、CRP、IL-1 $\beta$  的水平。同时也证实膏方组及阳性药组的组织中 NF- $\kappa$ B、PKC mRNA 及蛋白表达水平明显改变,可能是其治疗 STP 的机制之一。

本研究由于实验条件有限,日本大耳白兔的样本量相对较少,实验结果仍然需要大量的样本进一步证实,同时采血的时间点可以进一步细化,以精确血液高凝的时间及状态,同时药物的浓度以及其对高凝、炎症状态的影响也有待于进一步研究。

利益冲突:无。

## 参 考 文 献

- [1] 陈淑长主编. 实用中医周围血管病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 278.
- [2] 魏伟, 吴希美, 李元建主编. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 69-70.
- [3] 杨朔, 李辉, 许秋常. 甘露醇治疗早期脑出血对血肿扩大及预后的影响[J]. 中国实用医药, 2018, 13(9): 113-115.
- [4] 全梓林, 刘玉雪, 傅惠勤, 等. 甘露醇所致家兔耳缘静脉炎应用植物护理配方的效果评价[J]. 中国实用护理杂志, 2012, 28(14): 12-15.
- [5] 程艳玲, 张君利, 刘娜, 等. 复方白花蛇舌草颗粒对家兔静脉炎的防治作用研究[J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(5): 431-433.
- [6] Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, et al. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(5): 1720-1745.
- [7] 何春渝, 胡丽君. 不同方法静脉注射甘露醇对兔耳缘静脉及其周围组织的影响研究[J]. 中国药房, 2011, 22(41): 3870-3872.
- [8] Gorski L. Development of the 2011 infusion nursing standards of practice[J]. Int J Evid Based

- Health, 2010, 8(3): 169.
- [9] Ochi M, Kakehi Y, Tanaka Y, et al. Characterization of risk factor of nicardipine hydrochloride-induced venous irritation with cytotoxicity test on human vascular endothelial cells and irritability study in rabbit ear vein[J]. Jap J Pharm Health Care Sci, 2015, 41(12): 888.
- [10] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 28.
- [11] 李淑云. 中医体质辨证与膏方应用[C]. 2009 中国首届中医青方高峰论坛暨第四届金陵名医高层论坛论文集[A]. 南京: 中华中医药学会, 2009: 138-139.
- [12] 唐翎. 黄芪益气效用发微[J]. 上海中医药杂志, 2012, 46(2): 77-78.
- [13] 高兵. 丹参的药理作用及临床应用分析[J]. 中国现代药物应用, 2018, 12(1): 196-197.
- [14] 卫威. 黄芪-丹参对脂多糖致急性肺损伤大鼠的防治作用[J]. 环球中医药, 2018, 11(1): 30-33.
- [15] Chaowuttikul C, Palanuvej C, Ruangrunsi N. Pharmacognostic specification, chlorogenic acid content, and *In vitro* antioxidant activities of *Lonicera japonica* flowering bud[J]. Pharmacognosy Res, 2017, 9(2): 128-132.
- [16] 徐凤彩, 高向阳, 王炜军, 等. 蚯蚓体内营养和药物有效成分的研究[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(3): 86-89.
- [17] 曾柳庭, 刘慧萍, 杨凯麟, 等. 四物汤有效成分的关联性分析[J]. 中成药, 2017, 39(3): 576-582.
- [18] 陈静, 程羽, 夏永辉, 等. 四物汤及活血、养血药对慢性阻塞性肺疾病气道重塑及黏膜免疫的影响[J]. 中国医药导报, 2017, 14(7): 8-11, 23.
- [19] 韩婷婷, 彭垠婷. 补气活血类中药抗运动疲劳研究进展[J]. 体育科技文献通报, 2017, 25(12): 68-70.
- [20] 金潇, 朱陵群, 庞鹤. 益气活血解毒法对氧化低密度脂蛋白诱导内皮细胞黏附作用的影响[J]. 北京中医药, 2010, 29(8): 631-633.
- [21] 李晓庆, 杨博华. 脉络舒通颗粒外洗促进糖尿病足慢性溃疡愈合的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(5): 481-483.
- [22] Roumen-Klappe EM, den Heijer M, van Uum SH, et al. Inflammatory response in the acute phase of deep vein thrombosis [J]. J Vasc Surg, 2002, 35(4): 701-706.
- [23] Reiter M, Bucek RA, Koca N, et al. Deep vein thrombosis and systemic inflammatory response: a pilot trial[J]. Wien Klin Wochenschr, 2003, 115(3-4): 111-114.
- [24] 杨金升, 陈洪鑫, 吕同德. 肿瘤坏死因子在脑卒中时的表达及作用[J]. 国外医学脑血管病分册, 1996, 4(2): 77-80.
- [25] 庄舜玖, 景在平. 炎症因子在深静脉血栓形成及转归中的作用[J]. 上海医学, 2006, 29(7): 454-457.
- [26] van Aken BE, den Heijer M, Bos GM, et al. Recurrent venous thrombosis and markers of inflammation[J]. Thromb Haemost, 2000, 83(4): 536-539.
- [27] 李军明. 血清 C-反应蛋白鉴别小儿急性呼吸道感染的病原体 [J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(13): 1202.
- [28] 温红梅. C-反应蛋白和缺血性脑卒中[J]. 国外医学脑血管病分册, 2002, 10(4): 298-300.
- [29] Knoferl MW, Angele MK, Catania RA, et al. Immunomodulatory effects of dehydroepiandrosterone in proestrus female mice after trauma-hemorrhage[J]. J Appl Physiol, 2003, 95(2): 529-535.
- [30] Fox EA, Kahn SR. The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies [J]. Thromb Haemost, 2009, 94(2): 362-365.
- [31] 张春强, 黄河, 唐锡章, 等. 创伤性深静脉血栓形成中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10 的变化和作用[J]. 昆明医学院学报, 2007, 28(3): 30-34.
- [32] Tjoa T, Strausbaugh HJ, Maida N, et al. The use of flow cytometry to assess neutrophil infiltration in the injured murine spinal cord [J]. J Neurosci Methods, 2003, 129(1): 49-59.
- [33] Daniluk J, Liu Y, Deng D, et al. An NF- $\kappa$ B pathway-mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice [J]. J Clin Invest, 2012, 122(4): 1519-1528.
- [34] Baeuerle PA, Baltimore D.  $\kappa$ B: a specific inhibitor of the NF- $\kappa$ B transcription factor [J]. Science, 1998, 242(4878): 540-546.
- [35] Ward C, Dransfield I, Chilvers ER, et al. Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets [J]. Trends Pharmacol Sci, 1999, 20(12): 503-509.
- [36] Frazier WJ, Xue J, Luce WA, et al. MAPK signaling drives inflammation in LPS-stimulated cardiomyocytes: the route of crosstalk to G-protein-coupled receptors [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50071.
- [37] Ambrus L, Oláh A, Oláh T, et al. Inhibition of TR-PC6 by protein kinase C isoforms in cultured human podocytes [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(12): 2771-2779.

(收稿: 2017-04-11 在线: 2018-08-01)

责任编辑: 汤 静